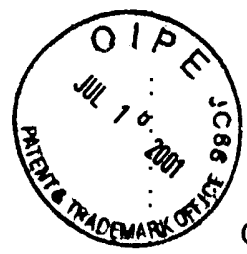


6

Attorney Docket No.: 04853.0066
Customer Number: 22,852

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



In re Application of:
Minoru TANAKA et al.

Serial No.: 09/814,047

Filed: March 22, 2001

Group Art Unit: 1638

Examiner: Not Yet Assigned

For: SEE-THROUGH MEDAKA

CLAIM FOR PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

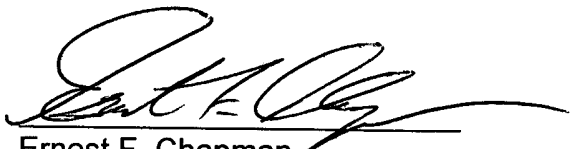
Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of Japanese Patent Application No. 2000-172375, filed on June 8, 2000, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

By: 
Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961

Date: July 16, 2001
EFC/FPD/sci
Enclosure

LAW OFFICES
FINNEGAN, HENDERSON,
FARABOW, GARRETT,
& DUNNER, L.L.P.
1300 I STREET, N. W.
WASHINGTON, DC 20005
202-408-4000

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2000年 6月 8日

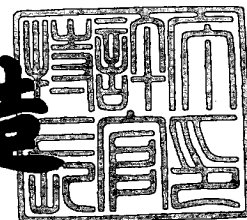
出願番号
Application Number: 特願2000-172375

出願人
Applicant(s): 若松 佑子
尾里 建二郎

2001年 4月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3026357

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0311

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成12年 6月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明の名称】 透明メダカ

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学生物分子応答
研究センター内

【氏名】 若松 佑子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学生物分子応答
研究センター内

【氏名】 尾里 建二郎

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 0 条西 8 丁目 北海道大学大学院
理学研究科内

【氏名】 田中 実

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学
研究科内

【氏名】 木下 政人

【特許出願人】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区唐山町 1 - 6 1 - 3 1 0

【氏名又は名称】 若松 佑子

【特許出願人】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区唐山町1-61-310

【氏名又は名称】 尾里 建二郎

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100107168

【弁理士】

【氏名又は名称】 安田 徹夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 透明メダカ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞を欠損していることを特徴とする透明メダカ。

【請求項 2】 虹色素胞欠損突然変異系統gu、アルビノ突然変異系統i-3、および白色素胞欠損突然変異系統lfのメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする、請求項 1 記載の透明メダカ。

【請求項 3】 請求項 2 記載の透明メダカにおいて、さらに虹色素胞欠損突然変異系統il-1のメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする透明メダカ。

【請求項 4】 虹色素胞、黒色素胞、および黄色素胞を欠損しており、かつ白色素胞の有無および／またはDNAマーカーにより性判別されることを特徴とする透明メダカ。

【請求項 5】 虹色素胞欠損突然変異系統gu、アルビノ突然変異系統i-3、白色素胞欠損突然変異系統lf、および雌白色素胞欠損突然変異系統FLFのメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする、請求項 4 記載の透明メダカ。

【請求項 6】 請求項 3 に記載の透明メダカと請求項 5 に記載の透明メダカとを選択的に交配させて作成することを特徴とする透明メダカ。

【請求項 7】 臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子の翻訳領域を融合した雑種遺伝子を導入することにより特定臓器を発光させることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の透明メダカ。

【請求項 8】 前記蛍光タンパク質遺伝子が緑色蛍光タンパク質遺伝子である、請求項 7 記載の透明メダカ。

【請求項 9】 前記臓器が生殖組織である、請求項 7 または 8 記載の透明メダカ。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な透明メダカ、性判別が可能な透明メダカ、および特定臓器が発光する透明メダカの開発に関する。

【0002】

【従来の技術】

メダカ (*Oryzias*) 属は15種が知られており、インドから日本までのアジア地域に分布する。日本に生息する種は*Oryzias latipes*で、この種は中国、韓国の一部にも生息する。日本では北海道を除く地域に分布し、自然界では5～8月にかけて産卵、繁殖する。

【0003】

通常の野生メダカは黒っぽい体色をしており、これはメダカの皮膚に存在する虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、白色素胞の4種類の色素細胞による。虹色素胞は銀色の色素細胞であり、グアニン顆粒を含む。鰓蓋、眼球、体腔壁、体表などに多量に分布しており、魚類では腹側に多い。黒色素胞はメラニン顆粒を含み、メダカの黒い体色に関与している。黄色素胞はカロチノイドおよびプテリジンを含む色素顆粒を有し、メダカの黄橙色の体色に関与している。また、白色素胞はプテリンと尿酸の詰まった白色顆粒を含み、メダカの白い体色に関与している。黒っぽい体色をした野生種のメダカ以外にも、体色や形態に関する様々な突然変異体が知られており、特に体色が黄橙色の「ヒメダカ」は観賞用として、また、大型観賞魚の餌として大量に生産されている。

【0004】

メダカは、体長2～4cmと小さいこと、性成熟まで2ヶ月と短期間であること、分布が広いため野生集団や近縁種が手軽に手に入ること、さらにゲノムサイズが哺乳動物の1/5であり、ヒト同様にXY染色体によって性決定されることなどから、手軽で有用な実験動物として汎用されている。特に、メダカの胚は透明性が高く内部構造の観察が容易であるため有用である。しかしながら、孵化後はその体表および腹膜が色素細胞で覆われるため、せいぜい背骨が透けて見える程度となり、外部から体内構造を観察することは困難となってしまう。

【0005】

一方、最近、ゼノパス（両生類）(Louie, A. Y.ら、In vivo visualization o

f gene expression using magnetic resonance imaging. Nature Biotechnology, 18, 321-325(2000)) やマウス(Service, R. F. Scanners get a fix on lab animals. Science, 286, 2261-2263 (1999))で特殊な遺伝子を導入して、その産物であるタンパク質をMRI (magnetic resonance imaging)、CTスキャナー(computed topography scanner)、PET(position emission topography)で追跡し、内部で起こっていることを画像化する試みがある。しかし、これらはいずれも大型の高価な装置を必要とするわりには、きわめて不十分な画像しか得られていない。

【0006】

さらに、現在、特定臓器をGFPの蛍光などで光らせることによって、その動態を一生追跡しようとする試みがある。マウスのがん組織でそのような研究が行われているが、皮下から2mmまでの深さのところを観察するのが精一杯である(Yang, M.ら、Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastasis. PNAS, 97, 1206-1211 (2000))。また、メダカの遺伝子プロモーターをGFP遺伝子に融合したものを受精卵に導入したトランスジェニック・メダカでGFP蛍光が発現することは以前から知られており(Hamada, K.ら、Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). Mol Marine Biol Biotech, 7, 173-180 (1998))、田中実と木下政人はvasa-GFP遺伝子をヒメダカの受精卵に導入して、生殖細胞だけが緑色の蛍光を発するトランスジェニック・メダカを作製した(第22回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集第458頁(1999)、田中実、木下政人、長濱嘉孝、「近交系vasa-GFP transgenicメダカによる生殖細胞形成解析系の確立」)が、このトランスジェニック・メダカでも蛍光が観察できるのはやはり孵化直後の時期までで、それ以後は体が色素細胞に覆われてしまい、観察は困難になる。

【0007】

上記したような理由から、体内構造をその一生を通じて外部から観察することのできる実験動物の開発が望まれているが、現在までそうした実験動物は脊椎動物では存在しない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明は、胚の時期だけでなく孵化後も体内構造を外部から観察することのできる透明メダカ、性判別の可能な透明メダカ、および特定臓器が発光する透明メダカを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、メダカの黒っぽい体色を構成する4種の色素細胞のうち1種以上を欠く突然変異メダカ同士を選択的に交配し続けることにより、胚期のみならず孵化後も外部から体内構造を観察できるメダカを作成し、本発明を完成するに至った。

【0010】

①すなわち本発明は、虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞を欠損していることを特徴とする透明メダカである。

②また本発明は、虹色素胞欠損突然変異系統gu、アルビノ突然変異系統i-3、および白色素胞欠損突然変異系統lfのメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする、上記①の透明メダカである。

【0011】

③また本発明は、上記②の透明メダカにおいて、さらに虹色素胞欠損突然変異系統il-1のメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする、透明メダカである。

④さらに本発明は、虹色素胞、黒色素胞、および黄色素胞を欠損しており、かつ白色素胞の有無および／またはDNAマーカーにより性判別されることを特徴とする透明メダカである。

【0012】

⑤また本発明は、虹色素胞欠損突然変異系統gu、アルビノ突然変異系統i-3、白色素胞欠損突然変異系統lf、および雌白色素胞欠損突然変異系統FLFのメダカを選択的に交配させて作成することを特徴とする、上記④の透明メダカである。

⑥また本発明は、上記③記載の透明メダカと上記⑤記載の透明メダカとを選択的

に交配させて作成することを特徴とする透明メダカである。

【0013】

⑦さらにまた本発明は、臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子の翻訳領域を融合した雑種遺伝子を導入することにより特定臓器を発光させることを特徴とする、上記①～⑥のいずれかに記載の透明メダカである。

⑧また本発明は、前記蛍光タンパク質遺伝子が緑色蛍光タンパク質遺伝子である、上記⑦記載の透明メダカである。

⑨また本発明は、前記臓器が生殖組織である、上記⑦または⑧に記載の透明メダカである。

以下に本発明を詳細に説明する。

【0014】

【発明の実施の形態】

(1) 本発明の透明メダカは、虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞を欠損していることを特徴とする。

「透明」とは、本明細書中で使用する場合、胚期のみならず孵化後のメダカにおいても、体内構造、例えば、脳、脊髄、血管、鰓、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、腸、浮き袋などを外部から肉眼で観察することが可能であることを意味する。

【0015】

「欠損している」とは、メダカにおいて上記4種の色素細胞(虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞)が各々全く存在しないか存在していても少数である、または前記細胞自体は存在していても、その細胞内の色素が存在しないかあるいは微量であって、肉眼的所見からはメダカの体色に対するその色素細胞の寄与が認められないことを意味する。

【0016】

本発明の透明メダカは、例えば、4種の色素細胞(虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞)のうち1種以上を欠損している体色突然変異メダカ同士を選択的な交配を繰り返すことにより作成することができるが、特にこれに限定されない。

【0017】

選択的な交配に用いる体色突然変異メダカとしては、限定するものではないが、例えば、虹色素胞欠損突然変異メダカ(例えば、gu系統およびil-1系統)、アルビノ突然変異メダカ(例えば、i-3系統)、白色素胞欠損突然変異メダカ(例えば、lf系統)を使用することができる。尚、これら各系統のメダカは名古屋大学生物分子応答研究センターに保管されており、分譲が可能である。

【0018】

具体的には、本発明の透明メダカは、虹色素胞欠損突然変異系統gu、アルビノ突然変異系統i-3、および白色素胞欠損突然変異系統lfのメダカを選択的に交配させることにより作成する(前記②の透明メダカ)。

また、さらに1種類以上の系統を選択的に交配して透明度をより高めた透明メダカも本発明の透明メダカであり、具体的には、前記②の透明メダカにさらに虹色素胞欠損突然変異系統il-1のメダカを選択的に交配させることにより作成する(前記③の透明メダカ)。

【0019】

本発明の透明メダカは、上記手法により作成する以外に、該透明メダカが保管されている名古屋大学生物分子応答研究センターから分譲により入手することもできる。

【0020】

(2) また、本発明の透明メダカは、虹色素胞、黒色素胞、および黄色素胞を欠損しており、かつ白色素胞の有無および／またはDNAマーカーにより性判別されることを特徴とする。

「白色素胞の有無により性判別される」とは、例えば、上記透明メダカの2日胚以降の時期において、実体顕微鏡で白色素胞の有無を観察することにより、雌雄が判別されることを意味する。

【0021】

「DNAマーカー」とは、本明細書中で使用する場合、遺伝的性に特異的であるDNAマーカーを意味し、「DNAマーカーにより性判別される」とは、例えば、メダカ個体のDNAをPCRに供してDNAマーカーを検出することにより雌雄が判別される

ことを意味する。

【0022】

性判別が可能な本発明の透明メダカは、例えば、前記②に記載の本発明の透明メダカと、白色素胞の存在にのみ性差のみられる系統および／またはDNAマーカーを有する系統とを選択的に交配し続けることにより作成できるが、特にこれに限定されない。

【0023】

白色素胞の存在にのみ性差のみられる系統とDNAマーカーを有する系統とは異なる系統であっても同一の系統であってもよく、白色素胞の存在にのみ性差のみられる系統としては、例えば、Qurt(Wada H.ら、Sex-linked inheritance of the *lf* locus in the medaka fish(*Oryzias latipes*). Zool. Sci. 15:123-126(1998)、東京大学大学院新領域創成研究科から分譲により入手可)を挙げることができる。また、同一の系統としては、例えば、FLF(female leucophore free)系統(雄のみが白色素胞およびDNAマーカー(SL1[Matsuda, M.ら、Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. Genes Genet. Syst. 72, 263-268 (1997)])を持つ：名古屋大学生物分子応答研究センターより分譲可)を挙げることができるが、これらに限定されない。また、DNAマーカー自体も上記SL1に限定されず、当業者に公知の任意のDNAマーカーを用いることができる。

【0024】

具体的には、性判別が可能な本発明の透明メダカは、前記②の本発明の透明メダカと上記FLF系統のメダカとを選択的に交配し続けることにより作成する(前記⑤の透明メダカ)。

また、さらに1種類以上の系統を選択的に交配して透明度をより高めた透明メダカも本発明の性判別が可能な透明メダカであり、具体的には、前記⑤の透明メダカにさらに前記③の透明メダカを選択的に交配させることにより作成する(前記⑥の透明メダカ)。

【0025】

性判別が可能な本発明の透明メダカは、上記手法による以外に、該メダカが保

管されている名古屋大学生物分子応答研究センターから分譲により入手することができる。

【 0 0 2 6 】

(3) さらに、本発明の透明メダカは、前記①～⑥の本発明の透明メダカに、臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子の翻訳領域を融合したものをさらに導入することにより特定臓器を光らせることを特徴とする。

【 0 0 2 7 】

発光させようとする特定臓器としては、例えば、生殖組織(生殖細胞)、脳、神経、肝臓、筋肉等が挙げられるがこれらに限定されるものではなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 2 8 】

臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、発光させようとする臓器により任意に選択することができるが、例えば、生殖組織(生殖細胞)に特異的な*vasa*遺伝子のプロモーターを用いることができる。

【 0 0 2 9 】

蛍光タンパク質遺伝子としては、限定するものではないが、例えば、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein; 以後、単に「GFP」と記す)遺伝子、青色蛍光タンパク質(BFP)遺伝子、黄色蛍光タンパク質(YFP)遺伝子等を挙げることができる。尚、これらの蛍光タンパク質遺伝子については、CLONTECH社(1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA)より入手可能である。

【 0 0 3 0 】

特定臓器を光らせることを特徴とする本発明の透明メダカは、例えば、発光させようとする臓器に特異的に発現する遺伝子プロモーターと蛍光タンパク質遺伝子の翻訳領域とを融合した雑種遺伝子を導入したトランスジェニック・メダカを作製し、これを1種類以上の体色突然変異メダカ系統と選択的に交配し続けることにより作成することができる。

【 0 0 3 1 】

前記臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターと前記蛍光タンパク質遺伝子

の翻訳領域とを融合した雑種遺伝子の作製および該雑種遺伝子を導入したトランスジェニック・メダカの作成は、当業者に公知の任意の方法により、例えば、本実施例に記載した方法に従って実施することができる。

【0032】

上記トランスジェニック・メダカとしては、例えば、生殖細胞に特異的(すなわち、生殖組織に特異的)に発現する $vasa$ 遺伝子のプロモーターとGFP遺伝子の翻訳領域とを融合した雑種遺伝子を導入して作製された $vasa$ -GFP系統(田中実ら、第22回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、前出)が挙げられるが、これに限定されない。

【0033】

前記トランスジェニック・メダカと交配する体色突然変異メダカ系統としては、例えば、当業者に公知のメダカ系統、前記①～⑥の透明メダカ系統、ならびに前記①～⑥の透明メダカ系統を作成する際に性染色体の交叉により生じた新たな系統、を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0034】

具体的には、特定臓器が光る本発明の透明メダカは、 $vasa$ -GFP系統のメダカ、前記②の透明メダカおよび前記⑤の透明メダカ(性判別が可能)を選択的に交配し続けることにより作成する(前記⑨の透明メダカ)。さらに、前記⑨の透明メダカの雌と前記⑨の透明メダカにおいて性染色体間の交叉により生じた白色素胞欠損(1f)の雄(実施例中「STII-YI- $vasa$ -GFP(1f)」)とを選択的に交配し続けることにより作成する透明メダカ(実施例中「STII-YII- $vasa$ -GFP」)、前記③の透明メダカと前記⑨の透明メダカとを選択的に交配し続けることにより作成する透明メダカ(実施例中「STIII-YI- $vasa$ -GFP」)、ならびにSTIII-YI- $vasa$ -GFP系統の透明メダカと該系統の透明メダカにおいて性染色体間の交叉により生じた白色素胞欠損(1f)の雄(実施例中「STIII-YI- $vasa$ -GFP(1f)」)とを選択的に交配し続けることにより作成する透明メダカ(実施例中「STIII-YII- $vasa$ -GFP」)もまた、特定臓器が光る本発明の透明メダカの好適な例である。

【0035】

また、特定臓器が光る本発明の透明メダカは、上記雑種遺伝子を前記①～⑥の

透明メダカに直接導入することによっても作成することができる。

雑種遺伝子の直接の導入は、当業者に公知の手法、例えば、遺伝子を一細胞期胚の細胞質にマイクロインジェクションする方法により実施することができる。

【0036】

特定臓器が光る本発明の透明メダカは、上記手法による以外に、該メダカが保管されている名古屋大学生物分子応答研究センターから分譲により入手することができる。

【0037】

【実施例】

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は単なる例示であって、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

〔実施例1〕 透明メダカの作製

① STII系統の作成

交配親として、名古屋大学に1960年代の初めから富田英夫によって収集された自然突然変異を中心として保存されてきた突然変異約120系統のうち、体色突然変異3系統(gu、i-3、lf)を用いて、本発明の透明メダカを作成した。これらの系統は、それぞれメダカの体色を構成する4種の色素細胞のうち1種以上を欠くものである。各系統の特徴を以下および表1に示す。

【0038】

(各系統の特徴)

gu: 虹色素胞欠損突然変異(図1 a)

虹色素胞は銀色の色素細胞で、魚類では腹側の皮膚に多い。腹側が白く光るのはこの細胞によっている。gu突然変異体では虹色素胞のグアニンの蓄積が少ない。特に、成魚では腹膜における蓄積が少ない。1978年、富田英夫によって三重県長島町で採集されたものから発見された。

【0039】

i-3: アルビノ突然変異(図1 b)

黒いメラニン色素を欠いていること、黄色素の蓄積が少ないこと、白色素胞が多いことから、皮膚が白い。網膜のメラニンもないために眼は赤く見える。腹膜

のメラニンもない。1976年、富田英夫によって鳥取市で採集されたものから発見された。

【0040】

lf: 白色素胞欠損突然変異(図1c)

白色素胞は白色の細胞で、黒色素胞と共に体色の変化に関わる。この系統では白色素胞が存在しない。1971年、富田英夫によって豊川市で収集された。

【0041】

【表1】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
gu	腹膜、皮膚、眼のグアニン沈着が少ない	gu/gu	三重県長島町 1978年	名古屋大学生物分子応答研究センター	可
i-3	アルビノ	i-3/i-3	鳥取市 1976年	名古屋大学生物分子応答研究センター	可
lf	白色素胞を欠く	$X^{lf}/X(Y)^{lf}$	豊川市 1971年	名古屋大学生物分子応答研究センター	可

【0042】

上記3系統を用いて、各親系統の特徴を全て有するメダカが得られるまで、下記表2に示すように選択的に交配を繰り返した。

【0043】

【表2】

交配データ

交配 No.	親の世代		子孫の世代		
	♀	♂	世代	遺伝子型	表現型
1	gu (i-3)	i-3 (gu)	F ₁	gu/+, i-3/+	+ ^{gu} , + ⁱ⁻³
2	F ₁	F ₁	F ₂	gu/gu, i-3/i-3 (F ₂ の1/16)*	gu, i-3
3	F ₂	lf	F ₃	gu/+, i-3/+, X ⁺ /X(Y) ^{lf}	+ ^{gu} , + ⁱ⁻³ , + ^{lf}
4	F ₃	F ₃	F ₄	gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf} /Y ^{lf} (F ₄ の1/64, すべて♂)	gu, i-3, lf (♂)
5	F ₃	F ₄	F ₅	gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf} /X(Y) ^{lf} (F ₅ の1/8)	gu, i-3, lf
6	F ₅	F ₅	F ₆	gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf} /X(Y) ^{lf} (全個体)	gu, i-3, lf

【0044】

(結果)

F₆世代において、親系統全ての特徴を有するメダカ、すなわち虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色素胞を欠損しているメダカ(遺伝子型: gu/gu, i-3/i-3, X^{lf}/X(Y)^{lf}、表現型 gu, i-3, lf)が得られた。

このメダカは体色が無く(すなわち体壁や腹膜が透明で)、外部から内蔵や脳などの内部器官を観察することができる(図2)。以後、この透明メダカ系統を「ST II(See-through medaka II)」と記す。

【0045】

② STIII系統の作成

上記で得られたSTII系統メダカよりさらに透明なメダカを得るため、このSTII系統と体色突然変異系統il-1(特徴を以下および表3に示す)とを用いて下記表4に示すように交配した。この交配では1a→2aと交配を進めるものと、1b→2bと進めるものの2種類の交配を並行して行った。1a→2aからは、四重突然変異を有する雌のF₂が得られた。また、1b→2bからは同様の雄のF₂が得られた。この雌雄を交配(交配No.3)することにより目的とする透明メダカF₃を得た。

【0046】

(系統の特徴)

STII : 本発明の透明メダカ。

il-1 : 体表および鰓蓋の虹色素胞が少ない。山形市で1972年に採集され、名古屋大学生物分子応答研究センターで保存されている。

【0047】

【表3】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STII	体壁や腹膜が透明	gu/gu, i-3/i-3, X ^{il} /X(Y) ^{il}	名古屋大学 2000年	名古屋大学生物分子応答研究センター	可
il-1	体表、鰓蓋の虹色素胞が少ない	il-1/il-1	山形市 1972年	名古屋大学生物分子応答研究センター	可

【0048】

【表4】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1a	STII	il-1	F ₁ -a	gu/t, i-3/t, il-1/t, X ^{il} /X(Y) ⁺	+ ^{gu} , + ⁱ⁻³ , + ^{il-1} , + ^{il}
2a	F ₁ -a	F ₁ -a	F ₂ -a	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{il} /X ^{il} . (F ₂ の 1/256, ♀のみ)	gu, i-3, il-1, lf (♀)
1b	il-1	STII	F ₁ -b	gu/t, i-3/t, il-1/t, X ⁺ /X(Y) ^{il}	+ ^{gu} , + ⁱ⁻³ , + ^{il-1} , + ^{il}
2b	F ₁ -b	F ₁ -b	F ₂ -b	♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{il} /Y ^{il} . (F ₂ の 1/256, ♂のみ)	gu, i-3, il-1, lf (♂)
3	F ₂ -a	F ₂ -b	F ₃	gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{il} /X(Y) ^{il} . (全個体)	gu, i-3, il-1, lf

【0049】

(結果)

F₃世代において、STII系統およびil-1系統両方の特徴を有する透明メダカ(遺

伝子型 : $gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X^{lf}/X(Y)^{lf}$, および表現型 : $gu, i-3, il-1, lf$) が得られた。

このメダカはSTII系統より虹色素胞が少なく、体壁や腹膜、鰓蓋の透明度がやや高い。また、体表の光の反射が少なく、内部器官の観察がより明確に行える。以後、このメダカ系統を「STIII (See-through medaka III)」と記す。

【 0 0 5 0 】

〔実施例 2〕 性判別が可能な透明メダカの作成

生殖に関わる実験（例えば環境ホルモンー内分泌攪乱化学物質の影響に関する実験）では実験動物の雌雄の性が個体発生の早期に、かつ誤差なく判別できることが必要とされる。従来、メダカの性別は臀鰭や背鰭の形態、雄の臀鰭上の乳頭状突起、産卵行動、体色(d-rR系統)により判断されるが、これらの方法には判別可能となるまでの孵化後の日数が、鰭の形態や乳頭状突起の場合1.5～2.5ヶ月、産卵行動の場合2～3ヶ月、d-rR系統における体色の場合でも2～3週間と長い、等の問題点がある。

【 0 0 5 1 】

そこで、本発明者らは、以下に記載する手法により、迅速な性判別が可能な透明メダカを作成した。

① STII-YI系統の作成

実施例 1 で作成したSTII系統と、白色素胞突然変異lfと野生型との交配により名古屋大学で2000年に作製された系統FLF(特徴を以下および表 5 に示す)とを交配親として用いて下記表 6 に示すように交配した。

【 0 0 5 2 】

(系統の特徴)

STII : 本発明の透明メダカ。

FLF : 前述の白色素胞突然変異lfと野生型との交配により名古屋大学で2000年に作製された。この系統ではlf遺伝子はX染色体上にあるので、雌は白色素胞を欠く。Y染色体のlf遺伝子座は野生型になっているので、雄には白色素胞がある。また、この系統のメダカは性特異的なDNA(PCR)マーカー(SL1)を有する。SL1はY染色体上の雄決定因子の近傍に位置する塩基配列であり、X染色体上ではその相

同部位に存在すると考えられている。このマーカーには多型が知られており、FLF系統ではY染色体上のものの方がX染色体上のものより短いため、PCRのバンドは雄ではY染色体由来のもの(L)とX染色体由来のもの(H)の2本が、雌ではX染色体由来のもの(H)1本が検出される。一方、上記STII系統では、SL1はXおよびY染色体間で差が無く、PCRのバンドは両性とも1本である。また、FLF系統のX染色体上のものとも差が見られない(すなわち(H)である)。下記表6に示した選択的な交配により、FLF系統のY染色体をF₁世代に導入することによってSL1(L)を導入した(SL1の詳細については、Matsuda, M.ら、Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. Genes Genet. Syst. 72, 263-268 (1997)を参照されたい)。尚、このマーカーによる性判別の誤差はこれまで知られていない(すなわち誤差0)。

【0053】

【表5】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STII	体壁や腹膜が透明	gu/gu, i-3/i-3, X ^{II, H} /X (Y) ^{II, H}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
FLF	雌：白色素胞を欠 き、SL1が1本 雄：白色素胞を持 ち、SL1が2本	♀: X ^{II, H} /X ^{II, H} ♂: X ^{II, H} /Y ^{+, L}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0054】

【表 6】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STII	FLF	F ₁	♀: gu/t, i-3/t, X ^{fl. H} /X ^{fl. H} ♂: gu/t, i-3/t, X ^{fl. H} /Y ^{t. L}	♀: + ^{gu} , + ⁱ⁻³ , lf, H ♂: + ^{gu} , + ⁱ⁻³ , + ^{fl} , H/L
2	STII	F ₁	F ₂	♀: gu/gu, i-3/i-3, X ^{fl. H} /X ^{fl. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, X ^{fl. H} /Y ^{t. L} (F ₂ の 1/4)	♀: gu, i-3, lf, H ♂: gu, i-3, + ^{fl} , H/L
3	F ₂	F ₂	F ₃	♀: gu/gu, i-3/i-3, X ^{fl. H} /X ^{fl. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, X ^{fl. H} /Y ^{t. L} (全個体)	♀: gu, i-3, lf, H ♂: gu, i-3, + ^{fl} , H/L

【0055】

(結果)

F₃世代において、STII系統およびFLF系統の両方の特徴を有する透明メダカ(表現型: 雌: gu, i-3, lf, H、雄: gu, i-3, +^{lf}, H/L)が得られた。雄では白色素胞の存在のために透明度がやや落ちるが、雌ではSTIIと同じ透明度であった。以後、このメダカ系統を「STII-YI」と記す。

【0056】

このメダカの遺伝的性は、白色素胞の有無により2日胚で判別した。また、さらにDNAマーカー(SL1)を用いて遺伝的性を判別した。

比較対照としてFLFW.Y^{HNI}系統(この系統は遺伝的性の判別マーカーを3つ持っている。1つ目は白色素胞の有無であり(♂有/♀無)、2つ目は体色(♂黄橙色/♀白色)、3つ目はSL1マーカー(♂バンド2本/♀バンド1本)である。未発表)を用いた。成魚の尾鰭の一部を切り取り、そのDNAを通常の方法(核酸抽出剤SepaGene(三光純薬))を用いて抽出した。その後、2つのSL1検出用プライマー(順方向プライマーpH05.5-F (5'-CCTGCAATGGGAAATTATTCTGCTC-3': 配列番号1)および逆方向プライマーpH05.5-RV (5'-CTTTTGTGTCTTTGGTTATGAAACGATG-3': 配列番号2))を用いて、以下表7および8の条件でPCRを行った。

【0057】

PCR産物の1%アガロースゲル/TBEによる電気泳動結果を図3 a (雌)およびb

(雄)に示す。尚、各レーンに用いたサンプルは以下表9の通りである。DNAマーカとして用いたバクテリオファージ λ c1857Sam7の λ -BstP I消化(Takara)サンプルおよび100bpのDNAラダー(Takara)は、それぞれ1.3 kbのバンド(λ -BstP Iの1371 bp)と1.5 kbのバンド(100 bp DNA ladderの1500 bp)を確認するためのDNAサイズマーカーである。

【0058】

【表7】

反応液組成

	μ L/1 サンプル	終濃度
H ₂ O	6.15	
10×緩衝液	1.0	
MgCl ₂ (25 mM)	0.6	1.5 mM
dNTP 混合物 (2.5 mM)	0.8	0.2 mM
プライマー-pH05.5F (10 pmol)	0.2	0.2 μ M
プライマー-pH05.5R (10 pmol)	0.2	0.2 μ M
サンプル DNA (10~20 ng/ μ L)	1.0	
LA Taq (5U/ μ L, Takara)	0.05	0.25 U/10 μ L
計	10.0	

【0059】

【表8】

PCR 条件

	温度(℃)	時間(分)
熱変性	95	5
27 サイクル		
熱変性	95	1.5
アニーリング	63	1.5
伸長反応	72	1.5
伸長反応	72	5
保存	4	

サーマルサイクラー : Gene Amp PCR system 2400-R (Perkin Elmer)

【0060】

【表 9】

図 3 a および b において各レーンに用いたサンプル

レーン	サンプル	
	図 3 a (雌) 系統およびサンプル番号	図 3 b (雄) 系統およびサンプル番号
1	λ-BstP I 消化 (Takara) * ¹	λ-BstP I 消化 (Takara) * ¹
2	FLFW. Y ^{BN1} 系統 1 2 8	FLFW. Y ^{BN1} 系統 1 5 4
3	1 2 9	1 5 5
4	1 3 0	1 5 6
5	1 3 1	1 5 7
6	1 3 2	1 5 8
7	1 3 3	1 5 9
8	STII-YI 系統 A	1 6 0
9	B	1 6 1
10	C	1 6 2
11	D	STII-YI 系統 C
12	100bp の DNA ラダー (Takara) * ²	D
13		E
14		100bp の DNA ラダー (Takara) * ²

*¹ : λ-BstP I 消化 (Takara) : バクテリオファージ λ c1857Sam7 を酵素 BstP I (Takara) で消化した DNA サイズマーカー。

*² : 100bp の DNA ラダー (Takara) : DNA サイズマーカー。

【0061】

(結果)

図 3 に示す泳動結果より、雄のメダカ全てにおいて 2 本のバンドが、雌のメダカ全てにおいて 1 本のバンドが検出された。

【0062】

② STII-YII系統の作成

上記①で得られたSTII-YI系統メダカの雄は白色素胞を有するため、雌に比べて透明度が低い。そこで、この点を改良するために、雌雄ともに白色素胞が無い系統を作成した。

親系統として、STII系統の雌と上記STII-YI系統においてX染色体とY染色体の交叉により生じた白色素胞欠損の雄(STII-YI(lf))(特徴を以下および表10に示す)とを用いて下記表11に示すように交配した。

【0063】

(系統の特徴)

STII：本発明の透明メダカ。

STII-YI(lf)：STII-YI系統においてX染色体とY染色体の交叉により生じた白色素胞欠損(lf)の雄。

【0064】

【表10】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STII の雌	体壁や腹膜が透明	♀: gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf, H} / X ^{lf, H}	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STII-YI 系統 で性染色体 の交叉によ り生じる lf の雄	体壁や腹膜が透明、遺 伝的性の判 別が可能	♂: gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf, H} / Y ^{lf, L}	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0065】

【表11】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STII	STII-YI (lf)	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf, H} / X ^{lf, H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf, H} / Y ^{lf, L} (全個体)	♀: gu, i-3, lf, H ♂: gu, i-3, lf, H/L

【0066】

(結果)

F₁世代において、STIIおよびSTII-YI両系統の特徴を有する透明メダカ(表現型：雌：gu, i-3, lf, H、雄：gu, i-3, lf, H/L)が得られた。透明度は雌雄共にSTIIと同程度であった。以後、このメダカ系統を「STII-YII」と記す。

これらのメダカの性判別は、上記①STII-YI系統と同様のPCRを行うことにより、DNAマーカーSL1のバンドを検出して実施した(データは示さず)。

【0067】

③ STIII-YI系統の作成

本発明者らはさらに、STII-YI系統よりさらに体壁や腹膜、鰓蓋の透明度の高い系統を作成するため、親系統としてSTII系統の代わりにSTIII系統を使用し、これを上記①で得られたSTII-YI(特徴を表12に示す)と下記表13に示すようにして交配した。

【0068】

【表12】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STIII 雌	体壁や腹膜、鰓蓋が透明	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{lf. H} /X ^{lf. H}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STII-YI 雄	体壁や腹膜が透明で遺伝的性のマーカーを持つ	♂: gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf. H} /Y ^{t. L}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0069】

【表13】

交配データ

交配 No.	親系統		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STIII	STII-YI	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/t, X ^{lf. H} /X ^{lf. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/t, X ^{lf. H} /Y ^{t. L}	♀: gu, i-3, + ^{il-1} , lf, H ♂: gu, i-3, + ^{il-1} , + ^{lf} , H/L
2	STIII	F ₁	F ₂	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{lf. H} /X ^{lf. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/ il-1, X ^{lf. H} /Y ^{t. L} (F ₂ の1/2)	♀: gu, i-3, il-1, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, + ^{lf} , H/L
3	F ₂	F ₂	F ₃	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{lf. H} /X ^{lf. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/ il-1, X ^{lf. H} /Y ^{t. L} (全個体)	♀: gu, i-3, il-1, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, + ^{lf} , H/L

【0070】

(結果)

F₃世代において、STIIIおよびSTII-YI両系統の特徴を有する透明メダカ(表現型: 雌: gu, i-3, il-1, lf, H、雄: gu, i-3, il-1, +^{lf}, H/L)が得られた。このメダカの遺伝的性は、STII-YI系統と同様にして白色素胞の有無により2日胚で判別し、さらに成魚の尾鰭より採取したDNAを用いてDNAマーカー(SL1)で確認した。この系統においては、雄では白色素胞の存在のためにやや透明度が落ちるが、雌ではSTIIIと同じ透明度が得られた。以後この系統を「STIII-YI」と記す。

【0071】

④ STIII-YII系統の作成

上記③で得られたSTIII-YI系統メダカの雄は白色素胞を有するため、雌に比べて透明度が低い。そこで、この点を改良するために、雌雄ともに白色素胞が無い系統を作成した。

親系統としてSTIII系統(前述、実施例1②)の雌を使用し、これを上記STIII-YI系統においてX染色体とY染色体の交叉により生じた白色素胞欠損(lf)の雄(STIII-YI(lf))(特徴を表14に示す)と下記表15に示すようにして交配した。

【0072】

【表14】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STIII 雌	体壁や腹膜、鰓蓋が透明	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{lf} H/X ^{lf} H	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STIII-YI 系 統で性染色 体の交叉に より生じる lfの雄	体壁や腹膜、鰓蓋が透明で遺 伝的性のマー カーを持つ	♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{lf} H/Y ^{lf} L	名古屋大学	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0073】

【表 15】

交配データ

交配 No.			子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STIII	STIII-YI (lf)	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{ll. II} /X ^{ll. II} ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, X ^{ll. II} /Y ^{ll. I} (全個体)	♀: gu, i-3, il-1, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, lf, H/L

【0074】

(結果)

F₁世代において、STIIIおよびSTIII-YI両系統の特徴を有する透明メダカ(表現型: 雌: gu, i-3, il-1, lf, H、雄: gu, i-3, il-1, lf, H/L)が得られた。透明度は雌雄共にSTIIIと同程度であった。以後、このメダカ系統を「STIII-YII」と記す。

これらのメダカの性判別は、上記①STII-YI系統と同様のPCRを行うことにより、DNAマーカー(SL1)のバンドを検出して実施した(データは示さず)。

【0075】

〔実施例3〕 生殖組織(生殖細胞)を光らせることを特徴とする透明メダカの作成

本発明者らは、本発明の透明メダカに生殖細胞で特異的に発現するvasa遺伝子のプロモーター領域とGFP(green fluorescent protein; オワンクラゲのタンパク質であり、青い光を当てると緑色の蛍光を発する)遺伝子の翻訳領域とを融合した雑種遺伝子を導入することにより、生殖組織(生殖細胞)でのvasa-GFPの蛍光を個体の若い時期だけでなく一生を通して観察することのできる系統を作成した。

【0076】

まず最初に、メダカの卵巣を液体窒素で凍結し破碎してホモゲナイズした。ここから全RNAを精製、さらにmRNAを精製し、それを鋳型にしてcDNAを合成した。これをベクターに組み込んでファージにパッケージングして卵巣cDNAライブラリーとした(四宮愛、田中実、小林亨、濱口哲、「vasa相同遺伝子の発現を指標と

したメダカ始原生殖細胞の同定と移動経路」、日本発生生物学会第32回大会発表要旨集第56頁、1999)。このライブラリーからメダカ $vasa$ cDNAを単離した。

【0077】

$vasa$ タンパク質はRNA結合ドメインであるDEAD Boxをもち、この領域は動物間で保存されていることが知られている。そこで次にこの領域に動物間で共通のプライマー(順方向プライマー1: 5'-ATGGCNTG(T/C)GCNCA(A/G)ACNG-3'(配列番号3)、逆方向プライマー2: 5'-(A/G)AANCCCAT(A/G)TC(T/C)AACAT-3'(配列番号4))を設計し、メダカcDNAライブラリー全体を鋳型としPCR(94℃で10分、94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分、を1サイクルとして39サイクル)を行い、増幅された $vasa$ cDNAの短い断片をアガロースゲルから精製してまずクローニングした。この断片がメダカ $vasa$ cDNAであることを塩基配列決定により確認した後、この断片をプローブとして再度メダカcDNAライブラリーをスクリーニングした。

その結果、全てのアミノ酸翻訳領域を含むと考えられる全長cDNAを単離してクローニングした。これがメダカ $vasa$ cDNAであることは塩基配列の決定により確認した(日本発生生物学会第32回大会発表要旨集、前出)。

【0078】

次に、メダカ $vasa$ -GFP遺伝子を構築した。 $vasa$ -GFP遺伝子はメダカ $vasa$ 遺伝子($olvas$)のプロモーター領域とGFP遺伝子の翻訳領域を融合した雑種遺伝子であり、メダカの $vasa$ 遺伝子($olvas$)の3'領域を、2つのプライマー(T7; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3': 配列番号5、VI-8; 5'-AGGAGGTGCCGTCATGGCTGGAG-3': 配列番号6)を用い、クローン化されたDNA(XLE13;メダカ $vasa$ 遺伝子($olvas$)の3'側にある)を鋳型として増幅した。

【0079】

得られた断片を制限酵素PstI/EcoRIで切断し、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化した。この断片をGFPベクター(pEGFP: CLONTECH社, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA)のStuI断面にクローン化し、これをpEGFP-3Vと名付けた。

【0080】

さらにメダカvasa遺伝子 (olvas) プロモーター領域を含む5.1kbのゲノム断片をプライマー (VP1M; 5' -CCTCCCAGTCGTCATATGAATCGTCTGAT-3' : 配列番号7、VP3; 5' -AGAGGATCCAATAGAATGAGTAATGGTTCTCTATTTC-3' : 配列番号8) を用い、ファージDNA (V5;メダカvasa遺伝子 (olvas) の大部分を含む) を鋳型として増幅した。得られた断片をNdeIで切断し、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、さらにKpnIで切断した。この断片をpEGFP-3VベクターのKpnI/平滑化されたNcoIサイトにクローン化し、遺伝子導入のためのベクター (VEGFPA) とした。尚、GFP遺伝子は市販されているので、これを購入して用いた (CLONTECH社 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA)

【0081】

次に、ヒメダカの受精卵を産卵から30分後に集め、付着糸をピンセットで除いた。上記ベクターVEGFPAをマイクロインジェクションによって、一細胞期胚の細胞質に注入した。注入した卵は25℃に保温してGFP蛍光の発現を蛍光実体顕微鏡で調べた。GFP蛍光を発現した胚や稚魚は分離して成魚になるまで育てた。これらの個体で性成熟したものを、正常個体 (遺伝子を注入していない) と一対ずつ交配して次世代の胚 (F_1) をえた。これらの胚 (F_1) についてGFP蛍光とGFP遺伝子の存在 (PCRで調べる) を調べた。これによってGFP遺伝子を次世代に遺伝させた親個体 (F_0) を特定した。これらの親個体からの子孫 (F_1) を交配してvasa-GFP・トランスジェニックメダカを作製した (より詳細な操作については、Keiko Hamadaら、"Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*)", Mol Marine Biol Biotech(1998)7(3), 173-180) を参照されたい)。この系統を「vasa-GFP」と記す (名古屋大学生物分子応答研究センターより分譲可)。

【0082】

① STII-YI-vasa-GFP系統の作成

上記vasa-GFP系統の雄、本発明のSTII系統の雌雄およびSTII-YI系統の雄 (各系統の特徴を表16に示す) を交配親系統として用いて、下記表17に示すように選択的に交配し続けた。

【0083】

【表 16】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
vasa-GFP 雄	生殖細胞が緑 色蛍光を持つ	vasa-GFP/-, X ⁺ . H / Y ⁺ . H	基礎生物学研 究所と京都大 学による 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STII 雌雄	体壁や腹膜が 透明	gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf. H} / X(Y) ^{lf. H}	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STII-YI 雄	体壁や腹膜が 透明、遺伝的性 の判別が可能	gu/gu, i-3/i-3, X ^{lf. H} / Y ⁺ . L	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0084】

【表17】

交配データ

交配 No.	親の世代		子孫の世代		
	♀	♂	世代	遺伝子型	表現型
1	STII	vasa-GFP	F ₁	gu/+, i-3/+, vasa-GFP/-, X ^{lf, H} / X(Y) ^{+, H} (F ₁ の1/2)	+ ^{gu} , + ⁱ⁻³ , vasa-GFP, + ^{lf} , H
2	F ₁	STII	F ₂	gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/- X ^{lf, H} / X(Y) ^{lf, H} (F ₂ の1/16)	gu, i-3, vasa-GFP, lf, H
3	F ₂	STII-YI	F ₃	♀: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/-, X ^{lf, H} / X ^{lf, H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/-, X ^{lf, H} / Y ^{+, L} (F ₃ の1/2)	♀: gu, i-3, vasa-GFP lf, H ♂: gu, i-3, vasa-GFP + ^{lf} , H/L
4	F ₃	F ₃	F ₄	♀: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/vasa-GFP, X ^{lf, H} / X ^{lf, H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/vasa-GFP, X ^{lf, H} / Y ^{+, L} (F ₃ の1/4)	♀: gu, i-3, vasa-GFP lf, H ♂: gu, i-3, vasa-GFP + ^{lf} , H/L
5	F ₄	F ₄	F ₅	♀: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/vasa-GFP, X ^{lf, H} / X ^{lf, H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/vasa-GFP, X ^{lf, H} / Y ^{+, L} (全個体)	♀: gu, i-3, vasa-GFP lf, H ♂: gu, i-3, vasa-GFP + ^{lf} , H/L

【0085】

(結果)

F₅世代において、3種の親系統vasa-GFP、STIIおよびSTII-YIの特徴を全て有するメダカ(表現型: 雌: gu, i-3, vasa-GFP, lf, H、雄: gu, i-3, vasa-GFP, +^{lf}, H/L)が得られた。遺伝的性は、白色素胞およびDNAマーカー(SL1)により実施例2①と同様にして判別した。雄は白色素胞の存在のため透明度はやや落ちるが、雌はSTIIと同じであった。以後、この系統を「STII-YI-vasa-GFP」と記す。

このメダカは体が透明であるため、蛍光を放つ生殖細胞の行動を胚期だけでなく、孵化後の成長の過程および成体まで、個体の一生を通して観察することができる。

【0086】

② STII-YII-*vasa*-GFP系統の作成

上記①で得られたSTII-YI-*vasa*-GFP系統メダカの雄は白色素胞を有するため、雌に比べて透明度が低い。そこで、この点を改良するために、雌雄ともに白色素胞が無い系統を作成した。

交配親系統として、上記STII-YI-*vasa*-GFP系統の雌と、上記STII-YI-*vasa*-GFP系統においてX染色体とY染色体間の交叉により生じた白色素胞欠損(If)の雄(STII-YI-*vasa*-GFP(If))(各系統の特徴を表18に示す)とを下記表19に示すように交配した。

【0087】

【表18】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STII-YI- <i>vasa</i> -GFP 雌	体壁や腹膜が透明、生殖組織(生殖細胞)が光る、遺伝的性の判別が可能	gu/gu, i-3/i-3, <i>vasa</i> -GFP/ <i>vasa</i> -GFP, X ^{If. H} /X ^{If. H}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応答研究センター	可
STII-YI- <i>vasa</i> -GFP 雄 生じる If の雄	体壁や腹膜が透明、生殖組織(生殖細胞)が光る、遺伝的性の判別が可能	gu/gu, i-3/i-3, <i>vasa</i> -GFP/ <i>vasa</i> -GFP, X ^{If. H} /Y ^{If. L}	名古屋大学 2000年	名古屋大学 生物分子応答研究センター	可

【0088】

【表 19】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STII-YI -vasa-G FP	STII-YI -vasa-G FP (lf)	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, vasa- GFP/vasa-GFP, X ^{lf. H} / X ^{lf. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, vasa- GFP/vasa-GFP, X ^{lf. H} / Y ^{lf. L} (全個体)	♀: gu, i-3, vasa- GFP, lf, H ♂: gu, i-3, vasa- GFP, lf, H/L

【0089】

(結果)

F₁世代において、2種の親系統STII-YI-vasa-GFPとSTII-YI-vasa-GFP(lf)との特徴を有するメダカが得られた。遺伝的性は、DNAマーカー(SL1)により実施例2①と同様にして判別した。雌雄ともに透明度はSTIIと同じであった。以後、この系統を「STII-YII-vasa-GFP」と記す。

このメダカは体壁や腹膜が透明で、生殖組織(生殖細胞)が光るため、生殖細胞の行動を胚期だけでなく、孵化後の成長の過程および成体まで、個体の一生を通して観察することができる。

【0090】

③ STIII-YI-vasa-GFP系統の作成

本発明者らはさらに、STII-YI-vasa-GFP系統よりさらに体壁や腹膜、鰓蓋の透明度の高い系統を作成するため、親系統としてSTII系統の代わりにSTIII系統(前述、実施例1②)の雌を使用し、これを上記①で得られたSTII-YI-vasa-GFPの雄(各系統の特徴を表20に示す)と下記表21に示すようにして選択的に交配し続けた。

【0091】

【表 20】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STIII 雌	体壁や腹膜、鰓蓋が透明、	gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, $X^{II, H} / X^{II, H}$	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可
STII-YI -vasa-G FP 雄	体壁や腹膜が透 明、生殖組織(生 殖細胞)が光る、 遺伝的性の判別 が可能	gu/gu, i-3/i-3, vasa-GFP/vasa-GFP, $X^{II, H} / Y^{+, L}$	名古屋大学 2000 年	名古屋大学 生物分子応 答研究セン ター	可

【0092】

【表 21】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STIII	STII-YI -vasa-G FP	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/+, vasa-GFP/+, $X^{II, H} / X^{II, H}$ ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/+, vasa-GFP/+, $X^{II, H} / Y^{+, L}$	♀: gu, i-3, + ^{il-1} , vasa-GFP, lf, H ♂: gu, i-3, + ^{il-1} , vasa-GFP, + ^{lf} , H/L
2	F ₁	F ₁	F ₂	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, vasa-GFP/vasa-GFP, $X^{II, H} / X^{II, H}$ ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, vasa-GFP/vasa-GFP, $X^{II, H} / Y^{+, L}$ (F ₂ の 1/16)	♀: gu, i-3, il-1 vasa-GFP, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, vasa-GFP, + ^{lf} , H/L
3	F ₂	F ₂	F ₃	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, vasa-GFP/vasa-GFP, $X^{II, H} / X^{II, H}$ ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, vasa-GFP/vasa-GFP, $X^{II, H} / Y^{+, L}$ (全個体)	♀: gu, i-3, il-1 vasa-GFP, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, vasa-GFP, + ^{lf} , H/L

【0093】

(結果)

F₃世代において、2種の親系統STIIIとSTII-YI-*vasa*-GFPの特徴を有するメダカが得られた。遺伝的性は白色素胞およびDNAマーカー(SL1)により実施例2①と同様にして判別した。雄は白色素胞の存在のため透明度はやや落ちるが、雌はSTIIと同じであった。以後、この系統を「STIII-YI-*vasa*-GFP」と記す。

このメダカは体壁や腹膜、鰓蓋の透明度が高く、生殖組織(生殖細胞)が光る。このため、生殖細胞の行動を胚期だけでなく、孵化後の成長の過程および成体まで、個体の一生を通して観察することができる。

【0094】

④ STIII-YII-*vasa*-GFP系統の作成

上記①で得られたSTIII-YI-*vasa*-GFP系統メダカの雄は白色素胞を有するため、雌に比べて透明度が低い。そこで、この点を改良するために、雌雄ともに白色素胞が無い系統を作成した。

交配親系統として、上記STIII-YI-*vasa*-GFP系統の雌と、上記STIII-YI-*vasa*-GFP系統においてX染色体とY染色体間の交叉により生じた白色素胞欠損(1f)の雄(STIII-YI-*vasa*-GFP(1f))(各系統の特徴を表22に示す)とを下記表23に示すように選択的に交配し続けた。

【0095】

【表22】

交配親系統

系統名	特 徴	遺伝子型	起 源	保管場所	分譲
STIII-YI- <i>vasa</i> -GFP 雌	体壁や腹膜、鰓蓋が透明、生殖組織(生殖細胞)が光る、遺伝的性の判別が可能	gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, <i>vasa</i> -GFP/ <i>vasa</i> -GFP, X ^{1f. H} /X ^{1f. H}	名古屋大学	名古屋大学生物分子応答研究センター	可
STIII-YI- <i>vasa</i> -GFP 雄	体壁や腹膜、鰓蓋が透明、生殖組織(生殖細胞)が光る、遺伝的性の判別が可能	gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, <i>vasa</i> -GFP/ <i>vasa</i> -GFP, X ^{1f. H} /Y ^{1f. L}	名古屋大学	名古屋大学生物分子応答研究センター	可

【0096】

【表 2 3】

交配データ

交配 No.	親の世代		子 孫 の 世 代		
	♀	♂	世代	遺 伝 子 型	表 現 型
1	STIII-YI -vasa-GFP P	STIII-YI -vasa-GFP P (lf)	F ₁	♀: gu/gu, i-3/i-3, il-1/il-1, vasa-GFP/ vasa-GFP, X ^{lf. H} / X ^{lf. H} ♂: gu/gu, i-3/i-3, il-1/ il-1, vasa-GFP/ vasa-GFP, X ^{lf. H} / Y ^{lf. L} (全個体)	♀: gu, i-3, il-1, vasa-GFP, lf, H ♂: gu, i-3, il-1, vasa-GFP, lf, H/L

【0097】

(結果)

F₁世代において、2種の親系統STIII-YI-vasa-GFPおよびSTIII-YI-vasa-GFP (lf)の特徴を有するメダカが得られた。遺伝的性は、DNAマーカー(SL1)により実施例2①と同様にして判別した。雌雄ともに透明度はSTIIIと同じであった。以後、この系統を「STIII-YII-vasa-GFP」と記す。

このメダカは体壁や腹膜、鰓蓋の透明度が高く、生殖組織(生殖細胞)が光る。このため、生殖細胞の行動を胚期だけでなく、孵化後の成長の過程および成体まで、個体の一生を通して観察することができる。

【0098】

【発明の効果】

本発明により、生物学、医学、水産学などの研究資源、有害化学物質の試験動物、小中高の理科教育の教材、さらには観賞魚としても有用な透明メダカを提供することができる。

【0099】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yuko, Wakamatsu and Kenjiro, Ozato

<120> See-Through Medaka

<130> P00-0311

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Oryzias latipes

<220>

<223> Other information: Forward primer pH05.5-F.

<400> 1

cctgcaatgg gaaattattc tgctc

25

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Oryzias latipes

<220>

<223> Other information: Reverse primer pH05.5-RV.

<400> 2

cttttgtgtc tttggttatg aaacgatg

28

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Other information: Common sequence found in animals. The sequence is used herein as a forward primer to amplify the short fragment of vasa cDNA.

<400> 3

atggcntgyg cncaracng

19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Other information: Common sequence found in animals. The sequence is used herein as reverse primer used to amplify the short fragment of vasa cDNA.

<400> 4

raancccatr tcyaacat

18

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> *Oryzias latipes*

<220>

<223> Other information: Primer T7 used to amplify the 3' region of vasa gene.

<400> 5

taatacgact cactataggg

20

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> *Oryzias latipes*

<220>

<223> Other information: Primer VI-8 used to amplify the 3' region of vasa gene.

<400> 6

aggaggtgcc gtcattggctg gag

23

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> *Oryzias latipes*

<220>

<223> Other information: Primer VP1M used to amplify 5.1 kb genomic frag

ment comprising the promotor region of vasa gene.

<400> 7

cctcccagtc gtccatatga atcgtctgat

30

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> *Oryzias latipes*

<220>

<223> Other information: Primer VP3 used to amplify 5.1 kb genomic fragment comprising the promotor region of vasa gene.

<400> 8

agaggatcca atagaatgag taatggttct ctatttc

37

【 0 1 0 0 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 順方向プライマー pH05.5-F。

配列番号 2 : 逆方向プライマー pH05.5-RV。

配列番号 3 : 動物間で共通してみられる配列。本明細書中ではこの配列を vasa cDNA の短い断片を増幅するための順方向プライマーとして使用する。

配列番号 4 : 動物間で共通してみられる配列。本明細書中ではこの配列を vasa cDNA の短い断片を増幅するための逆方向プライマーとして使用する。

配列番号 5 : vasa 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー、T7。

配列番号 6 : vasa 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー、VI-8。

配列番号 7 : vasa 遺伝子のプロモーター領域を含む 5.1 kb のゲノム断片を増幅するためのプライマー、VP1M。

配列番号 8 : vasa 遺伝子のプロモーター領域を含む 5.1 kb のゲノム断片を増

幅するためのプライマー、VP3。

【図面の簡単な説明】

【図1】

体色突然変異メダカの写真である。それぞれ、a：虹色素胞欠損突然変異系統gu、b：アルビノ突然変異系統i-3、およびc：白色素胞欠損突然変異系統lfのメダカの写真である。

【図2】

本発明の透明メダカ(STII系統)の写真である。

【図3】

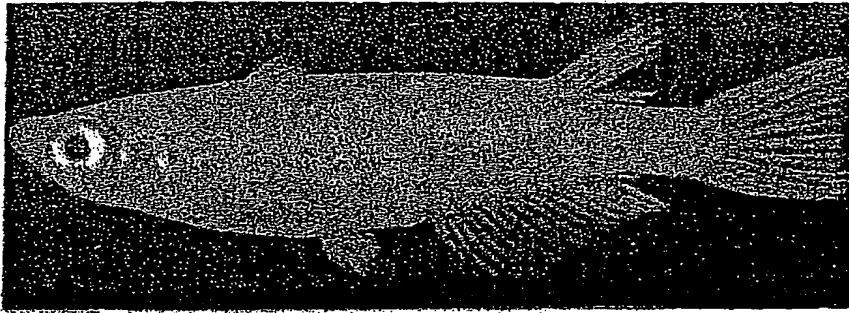
STII-YI系統におけるDNAマーカーSL1のPCR分析結果を示す電気泳動図である。

図3 a：STII-YI透明メダカ雌のDNAについての電気泳動結果である。レーン1および12はDNAのサイズマーカー、レーン2～7は他系統(FLFW.Y^{HNI})の雌個体、レーン8～11はSTII-YI系統の雌4個体(A,B,C,D)についての結果を示す。図3 b：STII-YI透明メダカ雄のDNAについての電気泳動結果である。レーン1および14はDNAのサイズマーカー、レーン2～10は他系統(FLFW.Y^{HNI})の雄個体、レーン11～13はSTII-YI系統の雄3個体(C,D,E)についての結果を示す。

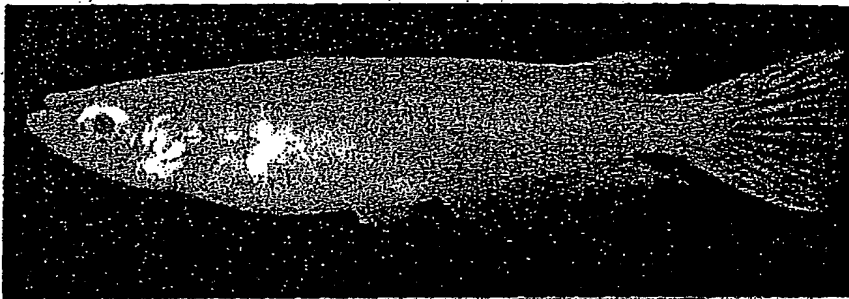
【書類名】 図面

【図1】

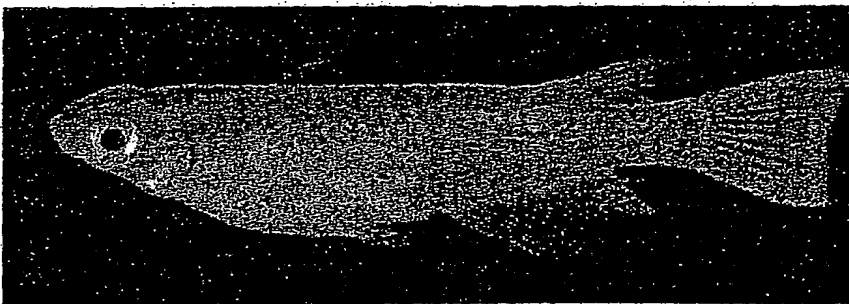
ST-IIの親系統



a : 虹色素胞欠損突然変異系統 gu



b : アルビノ突然変異系統 i-3



c : 白色素胞欠損突然変異系統 lf

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 胚の時期だけでなく孵化後も体内構造を外部から観察することのできる透明メダカ、遺伝的性の判別が可能な透明メダカ、および特定臓器が発光する透明メダカの提供。

【解決手段】 虹色素胞、黒色素胞、黄色素胞、および白色色素胞を欠損していることを特徴とする透明メダカ、虹色素胞、黒色素胞、および黄色素胞を欠損しており、かつ白色色素胞の有無および／またはDNAマーカーにより遺伝的性が判別されることを特徴とする透明メダカ、ならびに臓器特異的に発現する遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子の翻訳領域を融合した雑種遺伝子を導入することにより特定臓器を発光させることを特徴とする透明メダカの提供。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500269808]

1. 変更年月日 2000年 6月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区唐山町1-61-310

氏 名 若松 佑子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500269923]

1. 変更年月日 2000年 6月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区唐山町1-61-310

氏 名 尾里 建二郎